

DOCKET NO: 193582US0PCT

09/581241
533 Rec'd PCT/PTO 26 JUN 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Noriaki HATTORI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP98/05864

INTERNATIONAL FILING DATE: 24 DECEMBER 1998

FOR: LUCIFERASE AND METHODS FOR MEASURING INTRACELLULAR ATP USING
THE SAME

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

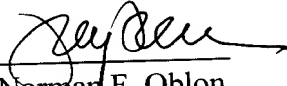
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the
applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
JAPAN	9/361022	26 DECEMBER 1997

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the
International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP98/05864**.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
William E. Beaumont
Registration No. 30,996



22850

(703) 413-3000

145182100
091581541
0000 0000 25 0000000000000000

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年12月26日

REC'D 19 FEB 1999
PO
ECT

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第361022号

出 願 人
Applicant (s):

キッコーマン株式会社

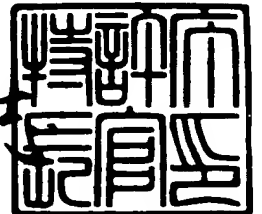
モタウ

PRIORITY DOCUMENT

1999年 2月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 建 夫



出証番号 出証特平11-3002680

【書類名】 特許願

【整理番号】 P97-0496

【提出日】 平成 9年12月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/02

【発明の名称】 ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

【氏名】 服部 憲晃

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

【氏名】 村上 成治

【特許出願人】

【識別番号】 000004477

【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ。

【請求項2】 ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外の他のアミノ酸に置換されたものである、請求項1記載のルシフェラーゼ。

【請求項3】 グルタミン酸以外の他のアミノ酸がリジンである、請求項2に記載のルシフェラーゼ。

【請求項4】 以下の(a)又は(b)からなる請求項1記載のルシフェラーゼ。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド

【請求項5】 以下の(a)又は(b)からなる請求項1記載のルシフェラーゼ。

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド

【請求項6】 請求項1乃至5のいずれかの項記載のルシフェラーゼをコードする、ルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項7】 請求項6記載のルシフェラーゼ遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項8】 請求項7記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項9】 請求項8記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼの製造法。

【請求項10】 細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法。

【請求項11】 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼが請求項1乃至5のいずれかの項記載のルシフェラーゼであることを特徴とする、請求項10に記載の細胞内ATPの測定法。

【請求項12】 発光試薬の添加による発光が、0.01%以上の界面活性剤の存在下で行なわれる請求項10または11に記載の細胞内ATPの測定法。

【請求項13】 界面活性剤がカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、ツイーターイオン界面活性剤のいずれかである請求項10、11、または12に記載の細胞内ATPの測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野では、試料中の細胞の有無や細胞数の計測等を目的として、細胞内ATPの測定が日常的に行なわれている。細胞内ATPの測定法においては、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするATP抽出試薬を添加して、細胞内ATPを細胞外に抽出した後、ルシフェラーゼを含む発光試薬を試料に添加し、生じる発光の発光量を測定する方法が一般的である。

【0003】

ルシフェラーゼは、ATPおよびマグネシウムイオンの存在下で、基質であるルシフェリンの発光反応を触媒する酵素である。細胞内ATPの測定法における

ルシフェラーゼとしては、例えばホタル（ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル等）を由来とするものが用いられている。

【0004】

細胞内ATPの抽出は、細胞を含む試料に、ATP抽出試薬を添加して攪拌することにより成し遂げられる。十分な抽出能力を発現させるためには、試料と抽出試薬を混合したときの混合液に対し、界面活性剤の濃度が0.05%以上になるように添加することが望ましい。しかし、界面活性剤の濃度が0.05%以上である場合、生物発光によりATP濃度を測定する工程で酵素反応を著しく阻害するため、測定感度および精度が大きく低下する。これは、高濃度の界面活性剤によりルシフェラーゼの活性が低下することが原因であると考えられている。例えば、アメリカホタルのルシフェラーゼは、0.1%の塩化ベンザルコニウムの存在下では、その活性が約20%にまで低下する（表1参照）。

一方、界面活性剤の濃度が低いと生物発光反応の阻害を小さくできるが、ATPの抽出効率が不十分となる。

【0005】

界面活性剤による発光反応の阻害を抑制する方法として、サイクロデキストリンまたはその誘導体を使用する方法は公知である（特表平6-504200号）。また、細胞を含む試料を界面活性剤と接触させて細胞内ATPを抽出し、次いでルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光反応法により該ATPを測定する方法において、ATP抽出後の試料をサイクロデキストリンと接触させた後に生物発光反応法を適用することを特徴とする細胞内ATPの測定方法も公知である（特開平7-203995号公報）。

しかしながら、ルシフェラーゼに注目して、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制しようとした試みはなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、界面活性剤が高濃度に存在する場合でも活性が低下しない界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼを提供することにある。また、本発明の目的は、界面活性剤を使用して細胞内ATPを抽出し、ついで該細胞内A

TPをルシフェラーゼを用いる生物発光反応法により測定する方法において、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内ATPの抽出効率を低下させることがない方法を提供することにある。

なお、ここでいう「抑制」とは、界面活性剤による生物発光反応の阻害を有意に低減すること、及び該阻害を完全に排除することを意味する。

【0007】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼである。

上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、490位のアミノ酸、またはゲンジボタルもしくはハイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸を、グルタミン酸以外の他のアミノ酸、例えばリジンに置換したものが挙げられる。

【0008】

また、上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、以下の(a)又は(b)からなるポリペプチド

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド、あるいは以下の(a)又は(b)からなるポリペプチド

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するタンパク質、が挙げられる。

【0009】

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子である。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードする

ルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクターである。

さらに、本発明は上記組換ベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを採取することを特徴とする該ルシフェラーゼの製造法。

【0010】

さらに、本発明は細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法である。

【0011】

【発明の実施の態様】

以下、本発明について詳述する。

〔界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて〕

本発明の界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて説明する。

「界面活性剤に耐性を有する」とは、次のいずれかの性質を有するものをいう。

(1) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での初発の発光量が増大するものをいう。ここでいう「比較」とは、例えば、公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に変異を導入して本発明のルシフェラーゼを作製する場合であれば、変異導入前のルシフェラーゼの発光量と、変異導入後のルシフェラーゼの発光量との比較を意味する。

(2) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での活性の低下が緩やかであることをいう。

(3) 0.4%の界面活性剤存在下で、85%以上の残存活性を有することをいう。

【0012】

以後、「界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ」を、「界面活性剤耐性ルシフェラーゼ」と表記する。

「活性」とは、生物発光反応の触媒活性を意味する。また、本発明でいう「界面活性剤」とは、細胞内ATPの測定系に使用されうるものであればいずれでもよく、例えば、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、ツイッター界面活性剤、非イオン性界面活性剤等が挙げられ、さらに具体的には、塩化ベンザルコニウムあるいは塩化ベンゼトニウム等の第4級アンモニウム塩を主成分とする試薬が挙げられる。

【0013】

本発明のルシフェラーゼは、発光性生物の発光器官等から調製することにより得られる。発光性生物としては、発光性昆虫、発光性細菌等が挙げられる。発光性昆虫としては、甲虫目(cleoptera)に属するもの、例えばホタル科やコメツキムシ科の昆虫、具体的には、ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル、ヒカリコメツキムシツチボタル、鉄道虫等が挙げられる。また、本発明のルシフェラーゼは、上記の発光生物からルシフェラーゼ遺伝子をクローニングし、該遺伝子を適当なベクター-宿主系を用いて発現させることにより得られる。

【0014】

さらに、本発明のルシフェラーゼは、従来公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に付加、欠失、置換等の変異を導入することにより得られる。アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、公知の遺伝子工学的手法を使用することができる。その場合、まず、上記の発光性生物を由来とするルシフェラーゼ遺伝子や既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に遺伝子工学的手法により付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築する。ついで、該変異型遺伝子を適当なベクター-宿主系に導入して組み換え微生物を作製する。さらに該組み換え微生物の中から、本発明のルシフェラーゼを生産するものをスクリーニングし、それを培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取すればよい。

【0015】

以後、アミノ酸配列に変異を導入することにより得られた界面活性剤耐性ルシフェラーゼを、「変異型ルシフェラーゼ」と表記することとする。

変異型ルシフェラーゼとしては、例えば、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外のアミノ酸に置換されたルシフェラーゼが挙げられる。グルタミン酸以外のアミノ酸としては、例えば塩基性アミノ酸、具体的には、リジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。「ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、確定したルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、ゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼの490位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意味するものである。

【0016】

なお、ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼでは、490位のアミノ酸はグルタミン酸である。また、アメリカホタルルシフェラーゼにおいて、「ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、487位のグルタミン酸である。

さらに具体的には、変異型ルシフェラーゼとは、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列のうちの1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0017】

[遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法]

以下に、遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法について説明する。

変異型ルシフェラーゼは、既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクター-宿主系により発現させることにより得られる。

【0018】

既知のルシフェラーゼ遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、具体的には、野生型ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子(特開平2-171189号公報に記載)、耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ

遺伝子（特開平5-244942号公報に記載）等が挙げられる。

i) ルシフェラーゼ遺伝子に変異を導入する方法としては、該遺伝子と変異原となる薬剤、具体的にはヒドロキシルアミン、亜硝酸、亜硫酸、5-ブロモウラシル等を接触させる方法を挙げることができる。この他、紫外線照射法、カセット変異法、PCR法を用いた部位特異的変異導入法等の方法を広く用いることができる。更には、化学合成したDNAをアニーリングして所望の部位に変異を有する変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築することも可能である。

【0019】

ii) 次いで、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を、プロモーター配列、マーカー遺伝子、複製起点等を有するベクターDNAに挿入して組み換え体プラスミドを得る。ベクターDNAは、宿主細胞で複製可能なものであれば如何なるものでもよく、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージDNA等が挙げられる。宿主細胞が大腸菌である場合のベクターDNAとしては、プラスミドpUC119（宝酒造社製）、pBluescript SK+（Stratagene社製）、pMAL-C2（NEW England Labs社製）、pGEX-5X-1（ファルマシア社製）、pXa1（ベーリンガー社製）、pMA56（G.Ammerer, Meth. Enzymol., 101, 192, 1983）等が使用できる。

【0020】

iii) 次いで、上記の組み換え体プラスミドを用いて適当な宿主細胞を形質転換又は形質導入し、変異型ルシフェラーゼの生産能を有する組み換え微生物をスクリーニングする。

宿主細胞としては、真核細胞及び原核細胞のいずれをも使用できる。真核細胞としては動物、植物、昆虫、酵母等の細胞が、原核細胞としては大腸菌、枯草菌、放線菌等が挙げられる。動物細胞としては、CHO、COS、HeLa細胞及びミエローマ細胞系統の細胞が、原核細胞としては、エッシェリシア属に属する微生物、例えば大腸菌JM101(ATCC 33876)、JM109（宝酒造社製）、XL1-Blue（Stratagene社製）、HB101(ATCC33694）等が使用できる。

【0021】

本発明においては、形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法（Meth. Enzymol., 68, 326-331, 1979）等により、形質導入は、例えば、B.Hohnの方法（Meth. En

zymol., 68, 299-309, 1979) 等により行うことができる。

組み換え微生物より組み換え体DNAを精製する方法としては、例えば、P. Guerryの方法 (J. Bacteriology, 116, 1064-1066, 1973)、D. B. Clewellの方法 (J. Bacteriology, 110, 667-676, 1972) 等を用いることができる。又、組み換え体DNAに挿入された遺伝子の塩基配列の決定は、例えば、Maxam-Gilbert法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560-564, 1977)、Dideoxy法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977) 等により行うことができる。

【0022】

iv) 上記の方法により得られた組み換え微生物を培地中で培養することにより、本発明の変異型ルシフェラーゼを生産することができる。

宿主細胞が大腸菌である場合、組み換え大腸菌を固体培養法で培養してもよいが、液体培養法により培養するのが好ましい。培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦ふすま浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄、あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。なお、培地の初発 pH は、pH 7~9に調製するのが適当である。また培養は30~42℃、好ましくは37℃前後で3~24時間、好ましくは5~8時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。

【0023】

組み換え大腸菌の培養終了後、培養物より変異型ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。すなわち、培養物を遠心分離して菌体を得た後、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破碎処理、磨砕処理等により菌体を破壊し、融合タンパク質を菌体外に排出させる。次いで、ろ過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去することにより、変異型ルシフェラーゼを含有する粗酵素液を得ることができる。

【0024】

本発明では、上記の粗酵素液をそのままタンパク質標品としてもよいが、通常

のタンパク質精製法を用いて、更に純度を高めてもよい。具体的には、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせて用いることができる。

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを使用することにより、細胞内ATPの抽出工程において、界面活性剤を高濃度に添加することが可能となる。

【0025】

〔本発明の細胞内ATPの測定法〕

以下に、本発明の細胞内ATPの測定法について説明する。

i) まず、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするATP抽出試薬を添加して、細胞内ATPを細胞外に抽出する。細胞とは、動物、植物、微生物（例えば、酵母、カビ、キノコ、細菌、放線菌、単細胞藻類、ウイルス、原生動物等）等を由来とする細胞を意味する。

【0026】

試料とは、上記の細胞を含むものであれば特に限定されないが、例えば、飲食物、医薬、化粧品、海水、河川水、工業用水、下水、土壌、尿、糞便、血液、喀痰、膿汁、上記細胞の培養物等が挙げられる。また、上記の試料を、適当な溶媒（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）に懸濁した溶液を試料としてもよい。検体液が固形分を含む場合には、該検体液を適当な溶媒に懸濁するか、ミキサーなどでホモジナイズすれば溶液状のものと同様に扱うことができる。

【0027】

また、上記溶液状の試料を、親水性または疎水性の濾過膜で濾過して細胞を捕捉した後に該濾過膜を試料としてもよい。細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、親水性濾過膜としては、例えば親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンフルオライド、親水性ポリアミド、アセチルセルローズ、ニトロセルローズ等を材料とするフィルム状又はシート状のものが使用できる。また、疎水性濾過膜としては、例えばPVDF（ポリビニリデンフルオライド）、PT

FE (ポリトラフルオロエチレン)、PE (ポリエチレン) 等を材料とするものが使用できる。

【0028】

界面活性剤としては、例えば、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、ツITTER界面活性剤、非イオン性界面活性剤等が挙げられる。アニオン界面活性剤としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ラウリル硫酸カリウム、モノラウロイルリン酸ナトリウム、アルキルベンスルホン酸ナトリウムがあげられる。カチオン界面活性剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム (BAC)、塩化ベンゼトニウム (BZC)、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ミリスチルジメチルベンジルアンモニウムがあげられる。また、両性界面活性剤としては、例えばTwittergent Detergent 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16、Tegoがあげられる。さらに非イオン性界面活性剤、例えば、Tween 20, 60, 80、Span 60, 80、Triton X-45, x-100、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテルがあげられる。

【0029】

界面活性剤の濃度は、充分なATP抽出能力を発現させる濃度であればいずれでもよいが、試料とATP抽出試薬を混合した時の混合液に対し、界面活性剤の濃度が好ましくは0.05%以上になるように添加する。

試料とATP抽出試薬との反応条件は、室温あるいは加温しつつ接触させればよい。

【0030】

ii) ATP抽出後の試料に界面活性剤耐性ルシフェラーゼを含む生物発光試薬を添加して発光を生じさせ、生じた発光を検出する。

界面活性剤耐性ルシフェラーゼがホタル由来のものである場合、生物発光試薬とは、例えば以下の(イ)～(ハ)の成分を含む試薬である。

(イ) 界面活性剤耐性ルシフェラーゼ

(ロ) ルシフェリン

(ハ) マグネシウムイオンまたは他の金属イオン

なお、発光試薬には上記の成分のほか、pH調製や保存性向上に関与する物質

を添加してもよい。そのような物質としては、例えば、EDTA 2Na、ジチオスレイ
トール、硫酸アンモニウム、シュークロース、2-メルカプトエタノール、HEPES
、Tricine、Tris、等が挙げられる。

【0031】

iii) 生物発光試薬の添加により生じた光の発光量は、ルミノメーター、例えば
キッコマン社製ルミテスターK-100、アロカ社製ルミネッセンスリーダーBL
R-201（改良型）、ベルトールド社製Lumat LB9501等により測定することが
できる。また、細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、生物発光画像解析シス
テム装置、例えばARGUS-50/CL〔テーパーファイバー付：浜松ホトニ
クス（株）社製〕を用いて濾過膜上の輝点を撮像することにより、細胞数を測定
することが可能である。

【0032】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら
の実施例にそのその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】 各種ホタル由来の天然型ルシフェラーゼの界面活性剤耐性
（各種ホタル由来の野生型ルシフェラーゼの調製法）

以下の方法に準じて、ゲンジおよびヘイケボタル由来のルシフェラーゼを調製
した。すなわち、25mMトリス（ヒドロキシ）アミノメタン-塩酸緩衝液に、1mM
エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム及び2mMフェニルメチルスルフォニルフル
オリドを添加し、更に硫酸アンモニウムを10%飽和となる如く添加して得た混液
（pH7.8）に、各種ホタルの尾部を添加してヒスコトロン〔（株）日音医理科器
械製作所製〕を用いて破壊した。得られた溶液を12,000r.p.m.で20分間遠心分離
し、上清を以下の精製工程の出発原料とした。精製は、硫酸アンモニウム塩析、
ウルトロゲル（Ultrogel）AcA34（LKB社製）カラム、ヒドロキシーアパタ
イトHPLC（東洋曹達工業社製、TSKgel HA-1000）カラムの工程により
行い、最終的に電気泳動的に単一な標品を得た。なお、アメリカホタル由来のル
シフェラーゼは市販品（Sigma社製、L-9506）を使用した。

【0033】

(ルシフェラーゼの活性測定法)

ルシフェラーゼ標品を酵素希釈液 (1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1% BSA, 50 mM HEPES, (pH 7.5)) にて適宜希釈し、その100 μ l に100 μ l の基質溶液 (1.4 mMルシフェリン, 40 mM ATP, 300 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM HEPES, (pH 7.5)) を添加した。発光量の測定は、BLR-201 Luminescence reader (アロカ社製) を用いて以下の設定条件で測定を行った。

測定レンジ: x100

表示数値: x1000

測定温度: 30℃

測定時間: 20秒間

この条件での測定値が1 Kcountの時の活性値を1 MLU (メガライトユニット) /mlとした。

【0034】

(界面活性剤耐性の測定法)

各種ホタル由来ルシフェラーゼ標品を0.5 MLU/mlの濃度になるよう酵素希釈液 (1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 5%グリセロール, 50 mM HEPES (pH 7.5)) を用いて調整し、酵素標品とした。

100 μ l の基質溶液 (4 mM ATP, 0.4 mMルシフェリン, 10 mM 硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)) に50 μ l の0.4%塩化ベンザルコニウム (25 mM Tricine (pH 7.75)) を添加し、さらに50 μ l の酵素標品を添加して、5秒攪拌した後、Berthold Lumat LB-9501にて1秒ごとに1分間の発光量を経時的に測定した。

【0035】

その結果を図2に示す。図中縦軸には、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの初発発光量を100%とした際の発光量の相対比をプロットしている。

この結果において、アメリカホタルルシフェラーゼは初発の発光量が低く、また発光量が急激に減衰しているのがわかる。これはアメリカホタルルシフェラーゼの界面活性剤耐性が低いためであり、感度の低下および測定値の精度の低下を

招く。これに対し、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼと比べ初発の発光量が高かった。すなわち、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼより界面活性剤耐性が優れていることが示された。さらにヘイケボタルルシフェラーゼはゲンジボタルルシフェラーゼより初発の発光量が高く、発光の減衰も緩やかであったことから、優れた耐性を示すことが明らかになった。この結果より、ルシフェラーゼの界面活性剤に対する耐性度は、起源とするホタルの種類により異なっていることが示唆された。

【0036】

【実施例2】 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの作製

以下の方法により、ヘイケボタルを由来とする2種類の変異型ルシフェラーゼ（「HLK」及び「HIK」と命名）を調製した。

（変異型ルシフェラーゼHLKをコードする遺伝子の作製）

PCRを用いた部位特異的変異法により、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。PCR反応の鋳型として特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Leu（プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がLeuをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド）を使用した。なお、該プラスミドが導入された大腸菌JM101株は、大腸菌（E. coli）JM101（pHLf7-217Leu）と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-3840として寄託されている。

【0037】

PCR反応のプライマーとして配列番号1、2で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、またDNA polymeraseとしてのKOD dash polymerase（TOYOBO社製）を使用した。KOD dash polymerase に付属の実施例に準じてGeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer社製）を用い、94℃で30秒、50℃で2秒、74℃で3分のサイクルを30サイクル繰り返し、PCR反応を行った。生じたPCR産物を常法に従ってLigationを行い、環状の組み換え体プラスミドpHLfLKを得た。

【0038】

pHLfLKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子のシーケンシングを行った。ダイプライマータックシーケンシングキット（アプライドバイオシステムズ社

製)を用いて反応を行い、ABI 373A DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行った。このようにして得られた変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号3に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号4に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ハイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた。

【0039】

pHLfLKを導入した大腸菌JM109株を、大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)と命名した(図1参照)。大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6147として寄託されている。

配列番号4に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼHLKと命名した。

【0040】

(変異型ルシフェラーゼHLKをコードする遺伝子の作製)

特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Ile(プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がIleをコードする遺伝子に置換された耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド)を用いて変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。該プラスミドによる形質転換株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-3841として寄託されている。

【0041】

pHLfLKをEcoRVおよびNarIで切断し得られた約560bpの断片をアガロースゲル電気泳動により取得し、同じ制限酵素で処理したpHLf7-217Ileに挿入した。

このようにして得られた組み換え体プラスミドをpHLfIKと命名し、該プラスミドを導入した大腸菌JM109株を大腸菌(E. coli) JM109(pHLfIK)と命名した。大腸菌(E. coli) JM109(pHLfIK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6146として寄託されている。

【0042】

pHLfIKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号5に、

また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号6に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がイソロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた（図1参照）。

配列番号6に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼH I Kと命名した。

【0043】

〔実施例3〕 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの調製

大腸菌 (*E. coli*) JM109(pHLfLK)及び大腸菌 (*E. coli*) JM109(pHLfIK)を、それぞれアンピシリンを含むLB培地〔バクトトリプトン1% (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl 0.5% (W/V)、アンピシリン (50 μ g/ml)、1.4% (W/V) 寒天〕に接種し、37℃で18時間培養を行なった。得られた培養液を、8000 r.p.m.で10分間の遠心分離し、沈殿した菌体を0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.8)、0.1 M 硫酸アンモニウム、1 mM EDTAに懸濁した後、超音波破碎した。

次いで、12000 r.p.m.で10分間遠心分離を行ない、粗酵素液を得た。得られた粗酵素液を前述した精製法により、電気泳動的に単一にまで精製した。

【0044】

〔実施例4〕 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの界面活性剤耐性 (発光の経時変化)

変異型ルシフェラーゼと公知のルシフェラーゼとの界面活性剤耐性を比較するため、前述した発光量の経時変化を測定した結果を図3に示す。図中「ヘイケI変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがIleに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ（特開平5-244942号公報）であり、「ヘイケL変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがLeuに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ（特開平5-244942号）である。また、「H I K」は実施例4で調製した変異型ルシフェラーゼH I Kであり、「H L K」は実施例4で調製した変異型ルシフェラーゼH L Kである。

【0045】

HIKは、ヘイケI変異体の490番目のGluをLysに置換した変異体である。HIKとヘイケI変異体とを比較すると、HIKの発光の減衰が緩やかであることがわかる。

また、HLKは、ヘイケL変異体の490番目のGluをLysに置換した変異体である。HLKとヘイケL変異体とを比較すると、HLKの初発発光量のほうが大きく、また発光の減衰が緩やかであることがわかる。

【0046】

また、変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKは、発光の減衰が野性型および耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼより緩やかになっている。上記の通り、490番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。特にHLKは初発の発光量も天然型より20%程度向上しており、HIKよりさらに耐性度が向上していることが明らかとなった。

【0047】

(発光率の比較)

発光の経時変化を測定する際に使用した酵素溶液、基質溶液および塩化ベンザルコニウムを用い、実際の発光測定条件下での測定値への影響を調べた。Berthold Lumat LB-9501を用い、待ち時間5秒、測定時間3秒の測定条件で求めた発光量を表1に示す。なお、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの発光量をコントロールとし、0.4%塩化ベンザルコニウム存在時の発光量をコントロール値で割った値を発光率(残存活性)として算出した。

【0048】

【表1】

各種ルシフェラーゼの発光率

ルシフェラーゼの種類	発光量 (RLU)		発光率 (%)
	抽出試薬なし	抽出試薬あり	
アメリカボタルルシフェラーゼ	452563	97790	21.6
ゲンジボタルルシフェラーゼ	409406	167805	41.0
ヘイケボタルルシフェラーゼ	425792	324724	76.3
ヘイケ変異体	422269	341039	80.8
ヘイケ変異体	423728	343634	81.1
HIK	386429	345159	89.3
HLK	390289	396764	101.7

【0049】

アメリカボタルルシフェラーゼは発光率が21.6%と最も低く、感度が大幅に低下することが示唆された。これに対しゲンジボタルルシフェラーゼおよびヘイケボタルルシフェラーゼの発光率はそれぞれ41.0%および76.3%であり、アメリカボタルルシフェラーゼと比較し感度低下の影響が少ないことがわかる。

一方、変異型ルシフェラーゼHIKおよびHLKの発光率はそれぞれ89.3%および101.7%であり、野性型のヘイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの発光率を大きく上回った。中でもHLKの発光率はほぼ100%であり、界面活性剤の有無にかかわらず同じ発光量を得ることが出来る。すなわち界面活性剤を用いても感度低下を全く受けず、精度の高い測定が可能であることが示された。

【0050】

(IC50の比較)

塩化ベンザルコニウムと各種ルシフェラーゼを10分間接触させ、活性の50%を失活させる塩化ベンザルコニウム濃度 (IC50) を求めた。前述した濃度に調整したルシフェラーゼ溶液と0.01~0.1%までの塩化ベンザルコニウムを等量で混和し、10分間室温で放置した。その後、100 μ lの基質溶液を添加して、Berthold L

umat LB-9501にて直ちに発光量を測定した。得られたIC₅₀を表2にまとめた。

【0051】

【表2】

各種ルシフェラーゼのIC₅₀

ルシフェラーゼの種類	IC ₅₀ (%)
アメリカホタルルシフェラーゼ	0.014
ゲンジボタルルシフェラーゼ	0.016
ヘイケボタルルシフェラーゼ	0.026
ヘイケI変異体	0.028
ヘイケL変異体	0.028
HIK	0.032
HLK	0.035

【0052】

野性型ルシフェラーゼ3種のうちアメリカホタルルシフェラーゼは最も低いIC₅₀を示し、界面活性剤に対する耐性が最も劣っていることが示された。ヘイケボタルルシフェラーゼは野性型の中で最も高いIC₅₀を示した。HLKおよびHIKは、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼのIC₅₀を更に上回り、490番目のアミノ酸の置換により耐性が向上したことが示された。中でもHLKのIC₅₀はHIKを上回り、最も界面活性剤耐性が優れていることが示唆された。

【0053】

〔実施例5〕 (細胞内ATPの測定法)

次に、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを用いた細胞内ATPの測定法について説明する。

なお、従来法として、トリクロロ酢酸 (TCA)により細胞内ATPを抽出し、抽出されたATP量をルシフェリン-ルシフェラーゼ発光反応により測定する方法 (TCA

抽出法)を採用した。TCA 抽出法はATP の抽出効率が非常に優れており、また、TCA を含む試料を100倍に希釈した後に発光を測定するので、TCA による発光反応の阻害も生じない。しかし、この希釈操作のため、TCA 抽出法は、操作が煩雑となり、また、測定感度の低下が起こるという問題がある。

【0054】

1. 実験材料

(1) 使用した界面活性剤

界面活性剤として、塩化ベンザルコニウム (BAC、日本薬局法のオスバン液) を使用した。上記界面活性剤を 0.25 %濃度で25mM Tricine(pH 7.75) に溶解したものを、ATP抽出用試薬とした。

(2) 使用した微生物

Escherichia coli(ATCC 25922)、*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) および*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) の4菌種を使用した。

【0055】

(3) 試料の調製

従来法では、上記微生物を普通ブイヨン培地 (栄研化学 (株) 製) で一晚35℃で培養して得られた培養液の原液を試料とした。一方、本発明の方法では、該培養液の原液を滅菌水で100倍希釈して得られた希釈液を試料とした。

(4) 使用したルシフェラーゼ

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼとして、HIK及びHLKを使用した。また、対照として公知のルシフェラーゼ種 (アメリカボタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ヘイケボタルルシフェラーゼ、ヘイケI変異体、ヘイケL変異体) を使用した。

【0056】

(5) 発光試薬

各種ルシフェラーゼを、0.15 mM ルシフェリン、6 mM EDTA、15 mM酢酸マグネシウム、0.2 mMジチオスレイトール、0.5 % BSA、25 mM HEPES(pH 7.75)の溶液に添加し、発光試薬として用いた。

添加するルシフェラーゼ量は、発光試薬100 μ l に等量の 2×10^{-8} MのATP 標準液を添加した時の発光量が、発光試薬として「ルシフェラーゼ LU」(キッコーマン社製) に付属の発光試薬を用いた時と同じになるように調整した。

【0057】

2. 細胞内ATPの測定法について

(1) 本発明の方法

試料100 μ lにATP抽出用試薬100 μ lを添加した。20秒間室温で放置した後、発光試薬100 μ lを添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

(2) 従来法

試料100 μ lに等量の10%のトリクロロ酢酸溶液を加えて1分間放置した。その抽出液に 9.8 ml の25mM Tricine(pH 7.75)を添加してよく攪拌した。この試料100 μ lに100 μ l の25mM Tricine(pH 7.75)および「ルシフェール LU」(キッコーマン社製) に付属の発光試薬100 μ lを添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

【0058】

3. 結果

結果を表3及び表4に示す。また、従来法(TAC抽出法)で得られた発光量を100%とした際に、各種ルシフェラーゼを用いた発光試薬で得られた発光量の相対比も表中に示した。

【0059】

【表3】

細胞内 ATP の測定

測定法	E.coli ATCC 25922		S.aureus ATCC 25923	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA 抽出法)	132794	(100.0)	130220	(100.0)
アメリカボタルルシフェラーゼ	153	(0.1)	163	(0.1)
ゲンジボタルルシフェラーゼ	463	(0.3)	659	(0.5)
ヘイケボタルルシフェラーゼ	76082	(57.3)	74019	(56.8)
ヘイケI変異体	47655	(35.9)	50031	(38.4)
ヘイケL変異体	46217	(34.8)	51243	(39.4)
HIK	97073	(73.1)	76533	(58.8)
HLK	87981	(66.3)	72182	(55.4)

【0060】

【表4】

測定法	P.aeruginosa ATCC 27853		E.faecalis ATCC 29212	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA 抽出法)	168141	(100.0)	12427	(100.0)
アメリカボタルルシフェラーゼ	553	(0.3)	113	(0.1)
ゲンジボタルルシフェラーゼ	1503	(0.9)	163	(1.3)
ヘイケボタルルシフェラーゼ	117096	(69.6)	8132	(65.4)
ヘイケI変異体	80455	(47.8)	4586	(36.9)
ヘイケL変異体	81069	(48.2)	4762	(38.3)
HIK	131134	(78.0)	7914	(63.7)
HLK	131815	(78.4)	7998	(64.4)

【0061】

アメリカボタルルシフェラーゼを用いた発光試薬は全く発光せず、またゲンジ

ボタルルシフェラーゼの場合も微弱な発光しか示さなかった。これは、ルシフェラーゼ自体が界面活性剤により失活してしまったためである。従って、これらのルシフェラーゼには、ATP抽出用試薬として本検討で用いたような高濃度の界面活性剤は使用出来ないことが示された。

一方、ハイケボタルルシフェラーゼの場合、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼと異なり、TCA抽出法の6～7割程度の発光が認められた。ハイケボタルルシフェラーゼは、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼより高い界面活性剤耐性を有することが示された。

【0062】

耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼであるハイケI変異体およびハイケL変異体の場合、得られた発光量はTCA抽出法の4割前後であり、野性型のハイケボタルルシフェラーゼの場合を大きく下回った。

ところで、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼ、すなわちHIK及びHLKの場合、得られた発光量は野性型ハイケボタルルシフェラーゼ及び耐熱性ルシフェラーゼを上回るものであった。また、この場合の発光量は、TCA抽出法の6～8割であった。

【0063】

HIK及びHLKは、ハイケI変異体およびハイケL変異体の490位のGluをLysに置換したものである。490位のアミノ酸への変異の導入により、界面活性剤に対する耐性が向上したものと考えられる。従って、HIK及びHLKは、本検討で用いたような高濃度のATP抽出用試薬に対しても感度低下は少ないので、これらを用いることにより、精度の高い測定が可能であることが示された。

【0064】

【発明の効果】

本発明により界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼが提供される。さらに、この新規なルシフェラーゼを用いて細胞内ATPを測定することにより界面活性剤が高濃度に存在する場合でもルシフェラーゼ活性が低下することなく細胞内ATPを測定することができる。

【0065】

【配列表】

配列番号 1

- (1) 配列の長さ: 23
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: 他の核酸 合成DNAプライマー
- (6) 配列: TGT TGT ACT TAA GAA AGG AAA AT

【0066】

配列番号 2

- (1) 配列の長さ: 23
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: 他の核酸 合成DNAプライマー
- (6) 配列: ACA GCT CCC GGA AGC TCA CCA GC

【0067】

配列番号 3

- (1) 配列の長さ: 1644
- (2) 配列の型: 核酸
- (3) 鎖の数: 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖
- (5) 配列の種類: DNA
- (6) 配列の特徴: pHLfLK中のルシフェラーゼ構造遺伝子の塩基配列

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC
CCT ATT GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC AAG TAT ATG GAT CGA TAT
GCA AAA CTT GGA GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT GTC GAT TAT ACG
TAC GCC GAA TAC TTA GAA AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG AAT TAT

GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC
 TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT
 GAG ATT TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA GGC ATC TCT AAG CCA ACA
 ATT GTA TTT AGT TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT GTA CAA AAA ACG
 GTA ACT GCT ATT AAA ACC ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT AGA GGT
 TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA
 TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG
 AAC TCT TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG CAA CTT ACT CAT GAA AAT
 TTG GTC ACT AGA TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA AAC CAA GTT TCA
 CCA GGC ACG GCT ATT TTA ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTT
 ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT
 CTT GTA CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT GAA TTA CTC GAT AAA TAT
 GAT TTA TCA AAT TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT TTA TCT AAA GAA
 ATT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA GGC TAT
 GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA
 CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT
 GAT ACT AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTA AAG GGT
 CCT ATG CTT ATG AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA AGA GAA ATC ATA
 GAT GAA GAA GGT TGG TTG CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA GAA AAA
 CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA
 GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT
 GCC GGC GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT GAG CTT CCG GGA GCT GTT
 GTT GTA CTT AAG AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAC GTT
 GCT AGT CAA GTT TCA AAT GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT GTG GAC
 GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA
 CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG 3'

【0068】

配列番号4

(1) 配列の長さ : 548

(2) 配列の型 : アミノ酸

(3) 鎖の数 : 一本鎖

(4) トポロジー : 直鎖

(5) 配列の種類 : ペプチド

(6) 配列の特徴 : pHfLK中のルシフェラーゼ構造遺伝子のアミノ酸配列

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr
Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr Met Asp Arg Tyr
Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly Val Asp Tyr Thr
Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr
Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe
Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn
Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr
Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly
Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met
Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn
Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser
Pro Gly Thr Ala Ile Leu Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe
Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe
Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp Lys Tyr
Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu
Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr
Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu
Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly
Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile

Asp Glu Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp
Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala Val
Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val
Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp
Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile
Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

【0069】

配列番号 5

(1) 配列の長さ : 1644

(2) 配列の型 : 核酸

(3) 鎖の数 : 一本鎖

(4) トポロジー : 直鎖

(5) 配列の種類 : DNA

(6) 配列の特徴 : pHLf IK中のルシフェラーゼ構造遺伝子の塩基配列

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC
CCT ATT GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC AAG TAT ATG GAT CGA TAT
GCA AAA CTT GGA GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT GTC GAT TAT ACG
TAC GCC GAA TAC TTA GAA AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG AAT TAT
GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC
TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT
GAG ATT TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA GGC ATC TCT AAG CCA ACA
ATT GTA TTT AGT TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT GTA CAA AAA ACG
GTA ACT GCT ATT AAA ACC ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT AGA GGT
TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA
TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG
AAC TCT TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG CAA CTT ACT CAT GAA AAT
ATC GTC ACT AGA TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA AAC CAA GTT TCA

CCA GGC ACG GCT ATT TTA ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTT
 ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT
 CTT GTA CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT GAA TTA CTC GAT AAA TAT
 GAT TTA TCA AAT TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT TTA TCT AAA GAA
 ATT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA GGC TAT
 GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA
 CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT
 GAT ACT AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTA AAG GGT
 CCT ATG CTT ATG AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA AGA GAA ATC ATA
 GAT GAA GAA GGT TGG TTG CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA GAA AAA
 CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA
 GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT
 GCC GGC GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT GAG CTT CCG GGA GCT GTT
 GTT GTA CTT AAG AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAC GTT
 GCT AGT CAA GTT TCA AAT GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT GTG GAC
 GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA
 CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG 3'

【0070】

配列番号 6

(1) 配列の長さ : 548

(2) 配列の型 : アミノ酸

(3) 鎖の数 : 一本鎖

(4) トポロジー : 直鎖

(5) 配列の種類 : ペプチド

(6) 配列の特徴 : pHLfIK中のルシフェラーゼ構造遺伝子のアミノ酸配列

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr
 Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr Met Asp Arg Tyr
 Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly Val Asp Tyr Thr

Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr
 Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn
 Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr
 Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
 Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly
 Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met
 Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn
 Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser
 Pro Gly Thr Ala Ile Leu Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe
 Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
 Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp Lys Tyr
 Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu
 Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr
 Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu
 Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly
 Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile
 Asp Glu Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
 His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp
 Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala Val
 Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val
 Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp
 Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

【図面の簡単な説明】

【図1】

変異型ルシフェラーゼHIKの遺伝子の作製図。

【図2】

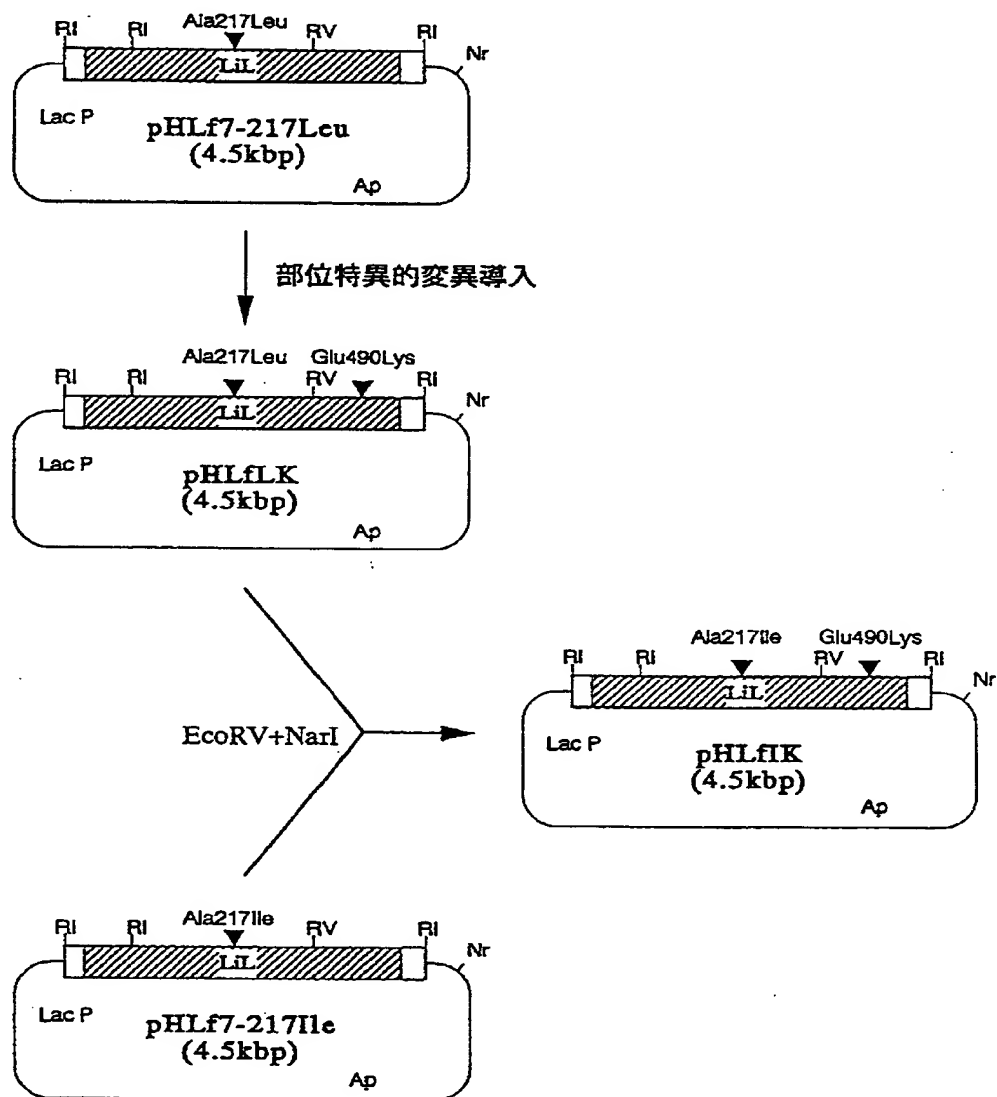
天然型ルシフェラーゼの発光量の経時変化を示す図。

【図3】

変異型ルシフェラーゼの発光量の経時変化を示す図。

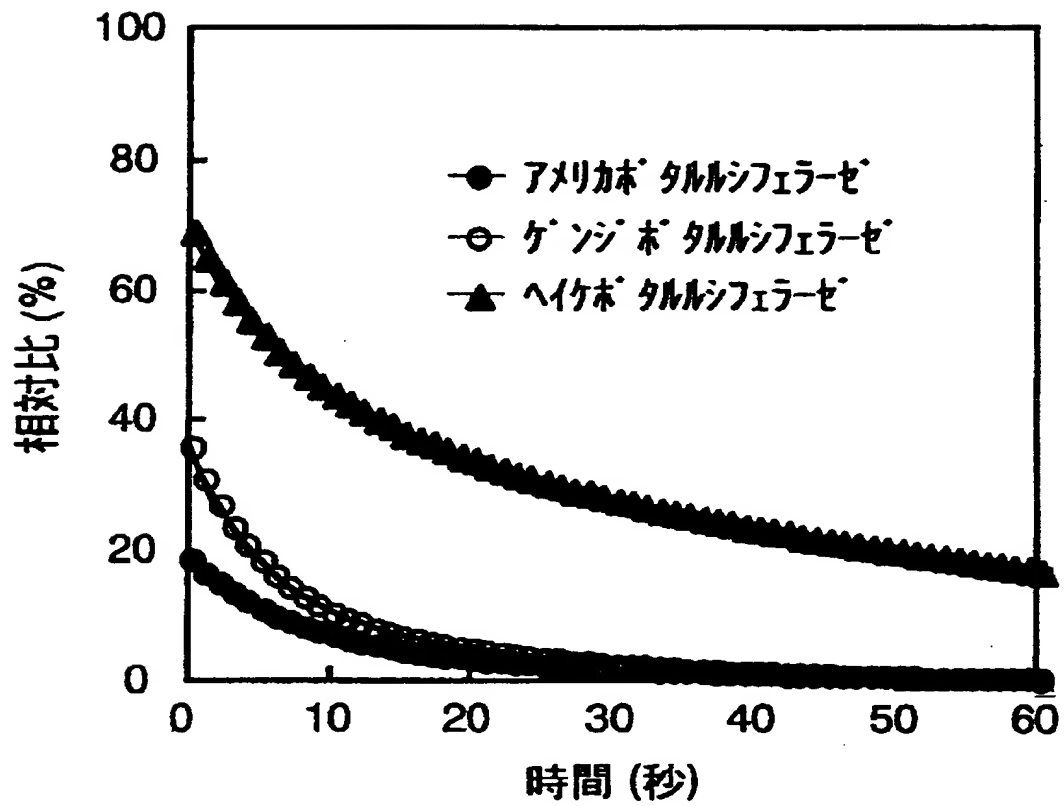
【書類名】 図面

【図1】

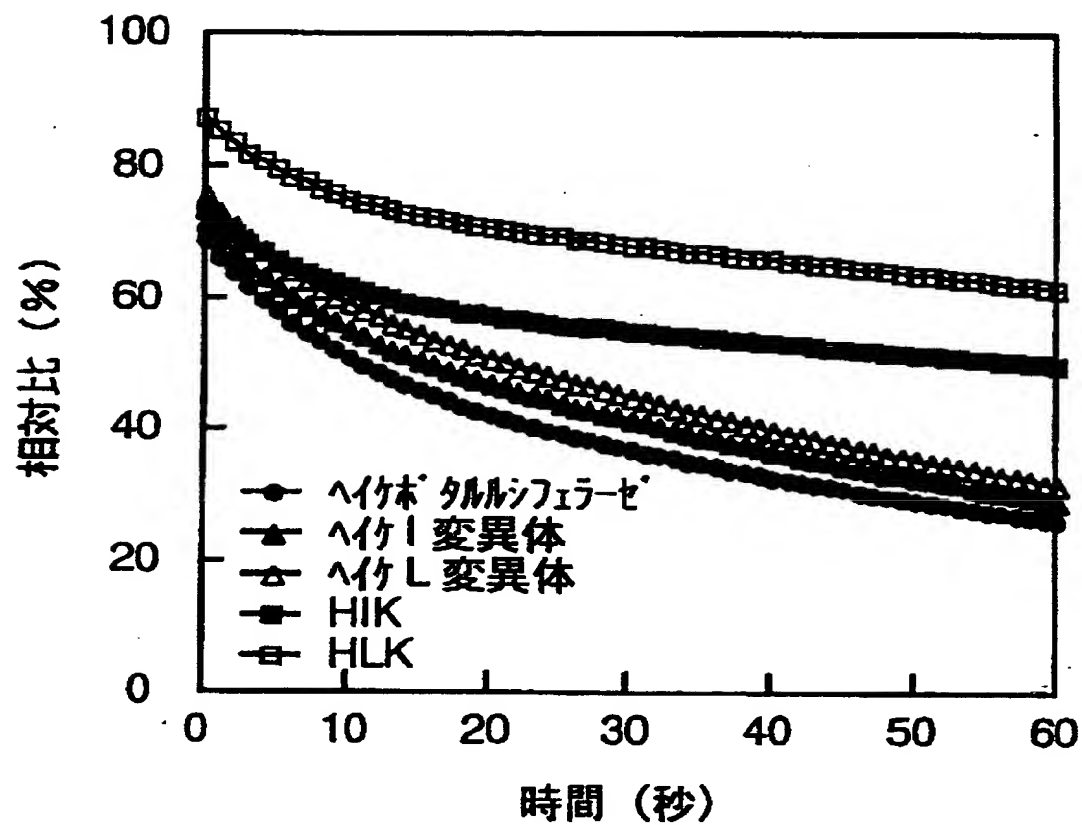


LIL; *Luciola lateralis* ルシフェラーゼ cDNA、Ap; β -ラクタマーゼ遺伝子、LacP; β -ガラクトシダーゼ プロモーター、Ri; *EcoRI*、RV; *EcoRV*、Nr; *NarI*.

【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ、及び細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法。

【効果】 本発明により界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼが提供され、この新規なルシフェラーゼを用いて細胞内ATPを測定することにより界面活性剤が高濃度に存在する場合でも生物発光反応の触媒活性が低下することなく細胞内ATPを測定することができる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000004477

【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地

【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビ
ル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビ
ル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 石井 貞次

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004477]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	千葉県野田市野田339番地
氏 名	キッコーマン株式会社

